

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

001130579

WPI Acc No: 1974-04186V/197403

Ampholyte mixtures - contg phosphonic and opt sulphonic acid gps

Patent Assignee: GRUBHOFFER N (GRUB-I)

Number of Countries: 003 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 2230743	A	19740110				197403 B
GB 1435744	A	19760512				197620
CH 582250	A	19761130				197652
DE 2230743	B	19800807				198033

Priority Applications (No Type Date): DE 137617 A 19720624; DE 2230743 A 19720623

Abstract (Basic): DE 2230743 A

Ampholyte mixtures as in DT 213 7617 contg. as basic molecule portion, ≥ 4 amino gps., and, as acid portion, ≥ 1 sulphonic acid or sulphate ester gp., with the modification that acid portion consists of ≥ 1 phosphonic acid gp. and opt. sulphonic acid gps. and may also contain COOH gps., leading to amphoteric buffers having const. buffer capacity at pH 3-10. Phosphonic acid gps. are introduced by reacting aq. polyamine with an aq. phosphonic acid or phosphonate, e.g. $\text{ClCH}_2\text{PO}_3\text{Na}_2$. Sulphonic acid/phosphonic acid ampholytes are prepd. by reacting aq. polyamine soln. with phosphonic acid/phosphonate, and adding propane sultone. COOH gps. are introduced by reacting with carboxylic acids, e.g. acrylic acid.

Title Terms: AMPHOLYTE; MIXTURE; CONTAIN; PHOSPHONIC; OPTION; SULPHONIC; ACID; GROUP

Derwent Class: E11; E16

International Patent Class (Additional): C07C-143/14; C07F-009/38; C25B-007/00

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): E05-G03

Chemical Fragment Codes (M3):

01 H1 M311 M312 M313 M314 M315 M316 M332 M334 M321 M322 M323 M280 M342
M340 M380 M360 M391 M392 M393 B720 B815 B819 B831 B415 B701 B702
B712 B713 B741 B742 B743 B744 B832 B833 K431 K432 K499 H182 H183
J171 J172 J173 M620 N000 N330 M510 M520 J012 J013 J014 M530 M540
M720 Q502 Q503 M411 M902

02 B415 B701 B702 B712 B713 B720 B741 B742 B743 B744 B815 B819 B831
B832 B833 H1 H100 H101 H102 H103 H182 H183 J011 J012 J013 J014 J171
J172 J173 K431 K432 K499 L560 M280 M311 M312 M313 M314 M315 M316
M321 M322 M323 M332 M334 M340 M342 M360 M380 M391 M392 M393 M411
M510 M520 M530 M540 M620 M720 M903 N000 N330 Q502 Q503

Ring Index Numbers: 70503

⑤① Int. Cl. 3 = Int. Cl. 2

Int. Cl. 2

C 07 F 9/38

C 07 C 143/14

⑤② **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

DEUTSCHES PATENTAMT



Auslegeschrift 22 30 743

⑥③

⑥④

⑥⑤

⑥⑥

⑥⑦

Aktenzeichen: P 22 30 743.3-42

Anmeldetag: 23. 6. 72

Offenlegungstag: 10. 1. 74

Bekanntmachungstag: 7. 8. 80

⑥⑧

Unionspriorität:

⑥⑨ ⑥⑩ ⑥⑪

⑥⑫

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung wäßriger Ampholytlösungen

⑥⑬

Zusatz zu: P 21 37 817.0

⑥⑭

Anmelder: Grubhofer, Nikolaus, Dr., 6900 Heidelberg

⑥⑮

Erfinder: gleich Anmelder

⑥⑯

Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
Nichts ermittelt

DE 22 30 743 B 2

Patentanspruch:

Weitere Ausbildung des Verfahrens zur Herstellung wäßriger Ampholytlösungen oder deren Gemischen aus den Umsetzungsprodukten a) einer wäßrigen Lösung von Pentaäthylenhexamin oder b) einer wäßrigen Lösung von Pentaäthylenhexamin, die mit Dimethylsulfat oder in methanolischer Lösung mit Alkylhalogeniden teilweise quaterniert und anschließend mit Hilfe eines Anionenaustausches von sauren Umsetzungsprodukten befreit worden ist mit Propansulton oder Bromäthansulfonsäure und Auftrennung durch Elektrophorese gemäß Patent 21 37 617.0, dadurch gekennzeichnet, daß man diese Umsetzungsprodukte zusätzlich mit Chlormethanphosphonsäure und einer ungesättigten Carbonsäure in an sich bekannter Weise in ein entsprechendes Derivate-Gemisch überführt.

Gegenstand des Patents 21 37 617.0 ist ein Verfahren zur Herstellung wäßriger Ampholytlösungen oder deren Gemischen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine wäßrige Lösung von Pentaäthylenhexamin oder eine wäßrige Lösung von Pentaäthylenhexamin, die mit Dimethylsulfat oder in methanolischer Lösung mit Alkylhalogeniden teilweise quaternisiert und anschließend mittels eines Anionenaustauschers von sauren Umsetzungsprodukten befreit worden ist, mit Propansulton oder Bromäthansulfonsäure in an sich bekannter Weise umsetzt und in üblicher Weise mittels Elektrophorese auftrennt.

In der Literatur, z. B. Swensson, H. (1962) Acta Chem. Scand. 16, 456—466; derselbe (1968) Protides of the Biol. Fluids 15, 515—522 ist gezeigt worden, daß die mit dem Verfahren der isoelektrischen Fokussierung erzielten Substanztrennungen um so schärfer werden, je größer die Anzahl der individuellen Ampholytkomponenten ist, von welcher der pH-Gradient getragen wird. Die Begründung hierfür ergibt sich wohl am anschaulichsten aus den Arbeiten von Leonard Ornstein (1964) Ann. New York Acad. Sci. 121, 321—44, welche im wesentlichen besagen, daß in reinem Wasser gelöste Elektrolyte mit verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten in einem elektrischen Feld eine Kette von scharf voneinander abgesetzten Zonen bilden, welche kontinuierlich in der Reihenfolge der Wanderungsgeschwindigkeiten aufeinander folgen und nirgends eine Lücke von reinem Lösungsmittel lassen. Die langsameren Zonen bremsen die schnelleren ab, die schnelleren beschleunigen die langsamen. Würde zwischen den Zonen eine Stelle mit reinem Wasser auftreten, so hätte diese im Vergleich zur Umgebung einen sehr hohen ohmschen Widerstand und es würde dadurch eine hohe Potentialdifferenz zwischen den benachbarten Zonen deren gegenseitige Anziehung bewirken. Diese Überlegungen gehen schon auf F. Kohlrausch zurück: (1897) über Konzentrations-Verschiebungen von Lösungen und Lösungsgemischen Ann. Phys. 62, 209—23. Wird die

führende Zone abgebremst oder kommt sie zum Stillstand (durch pH-Verschiebung oder durch Siebwirkung des Mediums) so laufen die anderen Zonen unter Erhöhung ihrer Konzentration dicht auf und bilden einen »Stack«, einen Stapel von scharfen »disks«. Auch die hier beschriebenen Trägerampholyte ordnen sich zu einem »Stack«, weil die führende Komponente am konzentrierten alkalischen Puffermilieu des Kathodenbereiches aufläuft. In jeder Zone wird das pH des isoelektrischen Punktes derselben meßbar.

Amphotere Substanzen, die man auseinander trennen möchte, etwa Proteine, sind damit nur Spezialfälle von Ampholyten, die sich im Stack einordnen. Mehrere Proteine mit dicht beieinanderliegenden pI's werden eine gemeinschaftliche Zone bilden, es sei denn es finden sich einige Trägerampholyte mit noch dazwischen liegenden pI's, welche als »spacers« oder Abstandszonen wirken können. Hierauf kommt für hohe Trennleistungen alles an.

In der letztzitierten Arbeit von H. Swensson wird festgestellt, daß es wünschenswert wäre, wenn die pI's einzelner Trägerampholyte um nicht mehr als 0,05 pH-Einheiten voneinander differieren würden. Für den Hauptbereich zwischen pH 3 bis pH 10 wäre also schon eine Zahl von 140 verschiedenen Ampholyten gefordert unter der Voraussetzung, daß deren pI's säuberlich nebeneinander gereiht wären, was natürlich nicht der Fall ist. Will man sicher sein, daß für jeden Teil des genannten Bereichs eine ausreichende Dichte an Einzelampholyten zur Verfügung steht, so wird man deren Anzahl um ein Vielfaches erhöhen müssen, ja diese Zahl kann gar nicht groß genug sein. Außerdem wird man dafür sorgen müssen, daß die pI's auch wirklich über den gesamten interessierenden Bereich gestreut sind, indem man Gruppen mit stark verschiedenen Dissoziationskonstanten in die Ampholyte einführt.

Die geschilderten Verhältnisse sind in den Fig. 1 und 2 veranschaulicht.

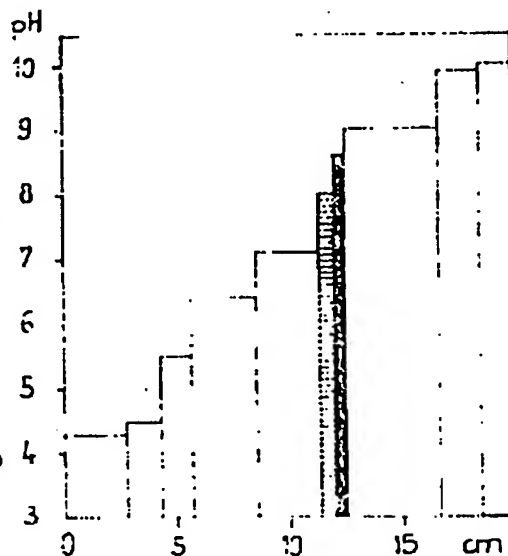


Fig. 1

»Schlechte«: Wenige Trägerampholyte bilden breite Zonen im Stack. Zwei im pI ähnliche Komponenten einer Proteinprobe liegen daher aufeinander und werden nicht getrennt.

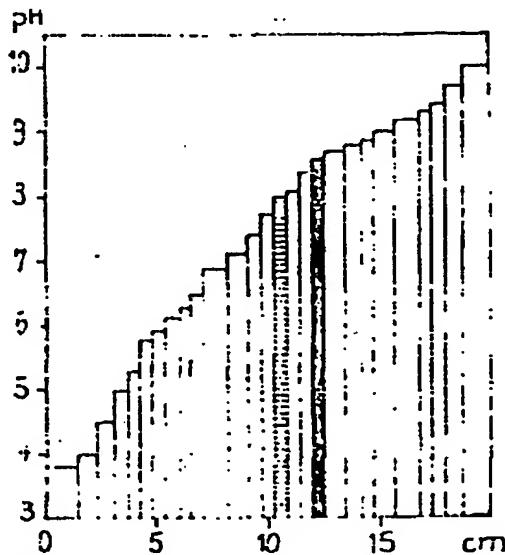


Fig. 2

»Gut«: Viele Trägerampholyte bilden einen reichhaltigen Stack. Auch zwischen die beiden Proteinkomponenten haben sich noch Trägerampholyt-Komponenten geschoben.

Die vorliegende Erfindung hat es sich zur Aufgabe gemacht, Ampholytgemische herzustellen, welche eine große Anzahl Einzelkomponenten und eine breite Streuung ihrer isoelektrischen Punkte aufweisen.

Es wird dabei von Polyaminosulfonsäuren ausgegangen, welche gemäß Patent 21 37 617.0 aus Polyäthylendipolyaminen durch Umsetzung mit Propansulton, oder Bromäthansulfonsäuren bzw. auch durch die Umsetzung von Pentaäthylhexamin, welches mit Dimethylsulfat oder in methanolischer Lösung mit Alkylhalogeniden teilweise quaternisiert und anschließend mit Hilfe eines Anionenaustauschers von sauren Umsetzungsprodukten befreit worden ist, erhalten worden sind. Dieses Ausgangsmaterial wird, wie am Beispiel Pentaäthylhexamin gezeigt wird, mit Acrylsäure und Chlormethanphosphonsäure nach folgendem Schema (s. Sp. 5 u. 6) umgesetzt.

Aus dem Reaktionsschema ersieht man, daß mit den vorgegebenen Partnern bei Variieren der Mengenverhältnisse eine große Zahl von Reaktionsprodukten zu erwarten ist. Die erfindungsgemäße Herstellung von Ampholytlösungen, welche sowohl Sulfonsäure- als auch Phosphonsäure- und Carbonsäuregruppen enthalten, wird nachfolgend anhand einiger Beispiele beschrieben. Der Einfachheit halber beziehen sich diese Beispiele auf die Weiterverarbeitung eines einfachen Umsetzungsproduktes zwischen Pentaäthylhexamin und Propansulton. Mit den methylierten Derivaten wird analog gearbeitet. Die Methodik lehnt sich eng an diejenige an, welche im Patent 21 37 617.0 ausführlich beschrieben worden ist. Die dabei verwendeten Umsetzungen von Polyäthylendipolyaminen mit Chlormethanphosphonsäure sind aus US-PS 28 41 611 bekannt. Umsetzungen von Polyäthylendipolyaminen mit Acrylsäure und ihren Homologen sind ebenfalls mehrfach beschrieben worden: Polyäthylendipolyamine mit Acrylsäure und Methacrylsäure: US-PS 21 95 974; Diäthylentriamin mit Acrylsäure und Crotonsäure: DBP 7 30 360; Tetraäthylpentamin mit Maleinsäure: US-PS 30 77 407.

Den anwendungstechnischen Fortschritt, welche erfindungsgemäße Vielkomponenten-Ampholyte ge-

genüber einfacheren Aminosulfonsäure-Ampholytgemischen bringen, kann man demonstrieren, indem man Vergleichsversuche mit verschiedenen Ampholyt-Typen unter sonst möglichst gleichen Versuchsbedingungen ablaufen läßt. Als Demonstrationsobjekt wurde Myoglobin aus Walfischmuskel ausgewählt, ein dem Blutfarbstoff verwandtes Protein, welches früher als einheitlich angesehen worden war, bei der isoelektrischen Fokussierung aber je nach Leistungsfähigkeit der angewandten Trennmethode eine Mikro-Heterogenität von vier scharf getrennten Komponenten aufweist. Im Patent 21 37 617 wurde die Versuchsanordnung pp 3/60 - 5/15 ausführlich beschrieben. Zur maximalen Ausnützung der Trennleistung wurde aber das von Davies, B. J. & Ornstein, L. (1964) Ann. New York Acad. Sci. 121, 350 eingeführte Polyacrylamid-Gel verwendet, um Konvektion im Elektrolyten zu verhindern.

Es wurden vier Versuche ausgewählt und das Trennergebnis nach Anfärben der Proteinfractionen durch Densitometrie dokumentiert. Die Fig. 3-6 zeigen den Verlauf der Lichtabsorption bei 560 nm gegen den mittels einer Mikroelektrode gemessenen pH-Verlauf im Gel.

Vergleichsversuch A

(Fig. 3)

Reaktionspartner:

Triäthylentetramin + 0,5 Mol/N Propansulton

Theoret. Zahl der Reaktionsprodukte:

$2^4 \cdot 0,5 = 8$

Ergebnis:

Trennung in 2 Komponenten nur angedeutet.

Kommentar:

Das »arme« Gemisch, im Prinzip nach dem Verfahren des Patents 21 37 617 hergestellt, leistet nicht genug.

Vergleichsversuch B

(Fig. 4)

Reaktionspartner:

Pentaäthylhexamin + 0,5 Mol/N Propansulton

Theoret. Zahl der Reaktionsprodukte:

$2^5 \cdot 0,5 = 32$

Ergebnis:

Die zwei Hauptkomponenten sind klar getrennt, die Gipfel sind auseinandergerückt, die beiden Nebenkomponten deuten sich an.

Kommentar:

Die Trennleistung entspricht dem bisherigen Stand der Technik.

Vergleichsversuch C

(Fig. 5)

Reaktionspartner:

Pentaäthylhexamin + 0,34 Mol Propansulton + 0,17 Val Chlormethanphosphonsäure

Theoret. Zahl der Reaktionsprodukte:

$3^6 \cdot 0,5 = 364$

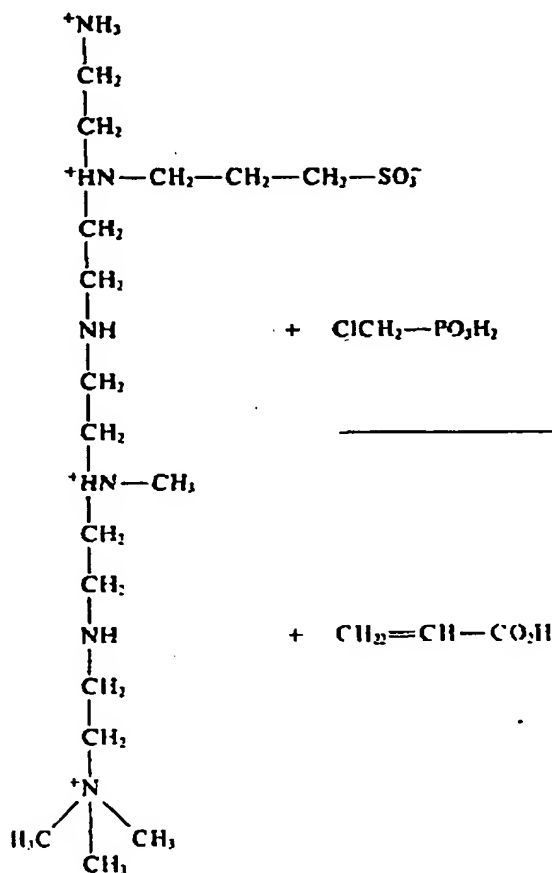
Ergebnis:

Die Hauptkomponenten noch weiter auseinandergerückt, die Nebenkomponten deutlich abgesetzt.

Kommentar:

Durch Hinzunahme der zweiten Reaktionskomponente wird die Trennung deutlich verbessert.

5



Vergleichsversuch D
(Fig. 6)

Reaktionspartner:

Pentaäthylenhexamin + 0,17 Mol Propansulton + 0,17 Mol Acrylsäure + 0,17 Val Chlormethanphosphonsäure.

Theoret. Zahl der Reaktionsprodukte:

$46 \cdot 0,5 = 2048$.

Ergebnis:

Scharfe Darstellung aller vier Komponenten.

Kommentar:

Im Einklang mit der Theorie bringt die erfindungsgemäße Ausweitung in Zahl und Bereich der Trägerampholyt-Komponenten eindeutig schärfere Substanztrennungen in der isoelektrischen Fokussierungstechnik.

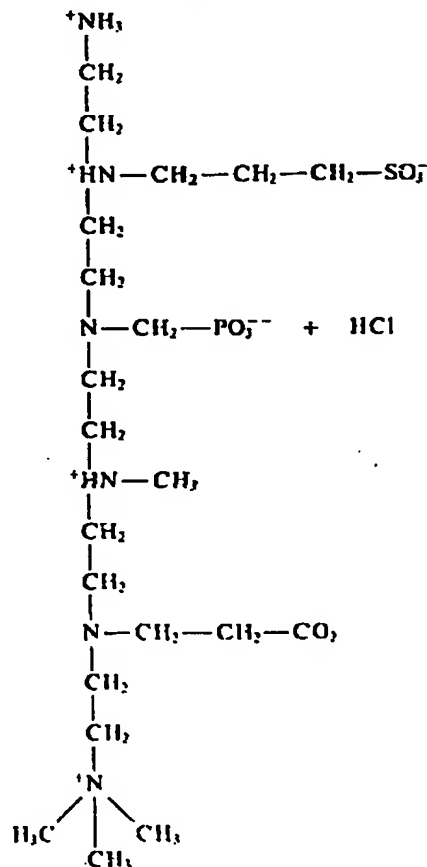
Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben:

Beispiel 1

(Herstellung des Ausgangsstoffes)

In einem 5-Liter-Dreihalskolben, der mit Rückflußkühler, Rührer und geheiztem Tropftrichter ausgerüstet ist, werden 446 g (2 Mol = 12 Atom N) Pentaäthylenhexamin mit 1850 g Wasser verdünnt. Dazu werden 244 g (2 Mol = 0,17 Mol/N) geschmolzenes Propansulton unter Rühren zulaufen gelassen. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wird 1 Stunde lang bei 65° gerührt. Das pH liegt bei 10,5.

6



Beispiel 2

(erfindungsgemäß)

Zu dem nach Beispiel 1 hergestellten Gemisch aus Aminosulfonsäuren kommen 126 g (1 Mol = 0,17 Val/N) Chlormethanphosphonsäure unter Rühren hinzu. Das Reaktionsgemisch bleibt 15 Stunden bei 65° stehen. Nunmehr werden 144 g (2 Mol = 0,17 Mol/N) Acrylsäure zugesetzt und weitere 2 Stunden bei 65° gehalten. Das Reaktionsgemisch enthält jetzt insgesamt 900 g Ampholytgemisch und wird mit Wasser auf 45 Liter einer 2%igen Lösung verdünnt.

Beispiel 3

(erfindungsgemäß)

Zu dem nach Beispiel 1 hergestellten Gemisch aus Aminosulfonsäure kommen 126 g (1 Mol = 0,17 Val/N) Chlormethanphosphonsäure unter Rühren hinzu. Das Reaktionsgemisch bleibt 15 Stunden bei 65° stehen. Nunmehr werden 108 g (1,5 Mol = 0,13 Mol/N) Acrylsäure und 129 g (1,5 Mol = 0,13 Mol/N) Crotonsäure zugesetzt und das Gemisch weitere 2 Stunden bei 65° gehalten. Das Reaktionsgemisch enthält jetzt insgesamt 1000 g Ampholytgemisch, welches zu 50 Liter in Wasser gelöst wurde.

Beispiel 4
(Elektrophorese)

a) allgemeine Methodik

60 Liter eines verdünnten Reaktionsgemisches, welches nach Beispiel 2 hergestellt wurde, kam zur Reinigung desselben von nichtamphoteren Substanzen und besonders von Chlorid-Ionen in ein mehrkammriges Elektrophoresegerät mit 21 Kammern, welche durch Platten aus porösem Keramikmaterial voneinander

Tabelle I

	Kammer-Nr.																	
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
pH des Inhaltes	11	10,1	9,3	8,8	8,3	7,9	7,5	7,3	6,9	6,6	6,2	5,9	5,5	5,1	4,8	4,2	3,0	

Die Kammern werden gleich nach der Elektrolyse entleert und in 7 Fraktionen vereinigt, die sich aus dem pH derselben ergeben, so wie dies in Tabelle II angegeben ist.

Tabelle II

Fraktion-Nr.	pH	Vol-Prozent
1	2-3,4	4
2	3,5-6,9	24
3	7-7,9	20
4	8-8,9	20
5	9-9,9	15
6	10-10,9	13
7	11-11,9	4

Die Vereinigung von Fraktion 2 und Fraktion 3 ergibt ein Material, welches unmittelbar für viele Versuche herangezogen werden kann. Mit dieser Fraktion wurde auch der Vergleichsversuch 5 ausgeführt.

Wünscht man Ampholytgemische zu erhalten, welche sich durch einen engeren pH-Bereich auszeichnen, so müssen die in Tabelle II aufgelisteten Fraktionen nach Beispiel 5c des Patents 21 37 617 einer Zweitelektrophorese unterworfen werden. Man findet dabei generell gegenüber den einfachen Aminosulfonsäure-Ampholyten einen flacheren Verlauf der pH-Kurve im gesamten Elektrophoresegerät, so daß man mehr individuelle Reaktionsansätze herstellen muß, um auch im stark sauren und alkalischen Bereich gute Ausbeuten zu

der abgetrennt sind. Weitere Einzelheiten sind in Beispiel 5 des Patents 21 37 617 beschrieben.

b) Elektrophorese

Nunmehr wird eine Gleichspannung von 200 Volt angelegt, die während 15 Stunden beibehalten wird. Nach dieser Zeit ist in den Kammern 4-18 kein Chlorid-Ion mehr nachzuweisen. Die Spannung wird dann im Laufe von 3 Stunden auf 1000 Volt erhöht. Die Messung des pH in den einzelnen Kammern ergibt eine Verteilung, die in Tabelle I wiedergegeben ist.

25

Beispiel 5

(Vergleichsversuch)

a) 44,0 g Triäthylentetramin mit 1850 g Wasser (12 Atom N) wurden mit 732 g (6 Mol) Propansulton gemäß Beispiel 1 umgesetzt und die auf 2% verdünnte Lösung der Elektrophorese gemäß Beispiele 4a und 4b unterworfen. Die pH-Fraktionen zwischen 3,5 und 8,0 wurden gesammelt und für den nachfolgenden Vergleichsversuch A verwendet.

b) 446 g Pentaäthylenhexamin mit 1850 g Wasser (12 Atom N) wurden mit 732 g Propansulton (6 Mol) ganz analog umgesetzt und durch einfache Elektrophorese aufgearbeitet. Die pH-Fraktion zwischen 3,5 und 8,0 wurde zur Ausführung des Vergleichsversuches B verwendet.

c) 446 g Pentaäthylenhexamin mit 1850 g Wasser (12 Atom/N) wurden 588 g Propansulton (4 Mol=0,34 Mol/N) nach Beispiel 1 umgesetzt und dann wurde nach einer Stunde 126 g Chlormethansulfonsäure (1 Mol=0,17 Val/N) zugegeben und die Reaktion bei 65° 15 Stunden lang fortgesetzt. Zur Aufarbeitung durch Elektrophorese wurde wie in den vorangegangenen Beispielen 4a und 4b verfahren. Die pH-Fraktionen 3,5-8,0 wurden für den Vergleichsversuch C verwendet.

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen

Fig.3

Versuchsvvergleich

A

Fig.4

Versuchsvvergleich

B

Fig.5

Versuchsvvergleich

C

Fig.6

Versuchsvvergleich

D

